



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Asociación entre cuadro clínico y especie de
Leishmania spp, en pacientes atendidos en el
Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de
Salud, 2006 – 2011**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Salud Pública

AUTOR

Aidé Clorinda SANDOVAL JUAREZ

ASESOR

César Arturo GUTIÉRREZ VILLAFUERTE

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sandoval A. Asociación entre cuadro clínico y especie de *Leishmania* spp, en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud, 2006 – 2011 [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2016.

120



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Fundada en 1551

FACULTAD DE MEDICINA



UNIDAD DE POST GRADO

ACTA DE GRADO DE MAGISTER8/12
51

En la ciudad de Lima, a los 04 días del mes de octubre del año dos mil dieciséis, siendo las 14.30 horas, bajo la presidencia del Dr. Eduardo Rómulo Ticona Chávez con la asistencia de los Profesores: Mg. Javier Roger Raúl Vargas Herrera (Miembro), Mg. Sonia Shishido Sánchez (Miembro) Mg. Hernán Arturo Sanabria Rojas (Miembro) y el Mg. César Arturo Gutiérrez Villafuerte (Asesor); la postulante al Grado de Magister en Salud Pública, Rachiller en Ciencias Biológicas, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **"ASOCIACIÓN ENTRE CUADRO CLÍNICO Y ESPECIE DE Leishmania spp, EN PACIENTES ATENDIDOS EN EL LABORATORIO DE LEISHMANIOSIS DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, 2006 - 2011"** con el fin de optar el Grado Académico de Magister en Salud Pública. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **C BUENO 15**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN SALUD PÚBLICA** a la postulante **AIDÉ CLORINDA SANDOVAL JUAREZ**. ✓

Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo las 15:50 horas, se da por concluido el acto académico de sustentación.

Mg. Javier Roger Raúl Vargas Herrera
Profesor Auxiliar
Miembro

Mg. Sonia Shishido Sánchez
Profesora Auxiliar
Miembro

Mg. Hernán Arturo Sanabria Rojas
Profesor Principal
Miembro

Mg. César Arturo Gutiérrez Villafuerte
Profesor Asociado
Asesor

Dr. Eduardo Rómulo Ticona Chávez
Profesor Auxiliar
Presidente

DEDICATORIA

A Dios, quien supo guiarme por el buen camino y darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi padre y hermanos que están en el cielo y como ángeles guardianes me cuidan.

A mi madre por su amor y consejos, en los momentos difíciles, quien me inculcó valores, principios y a perseverar para conseguir mis objetivos.

A mis hermanas y hermanos por su fuerza moral y apoyo incondicional para lograr mis metas.

AGRADECIMIENTO

*Al Dr. César Gutiérrez Villafuerte, por
su asesoría en esta Tesis*

*A mis colegas Gloria Minaya
Gómez y Nyshon Rojas Palomino,
del Laboratorio de Leishmaniosis,
por su apoyo en la ejecución del
estudio.*

ÍNDICE

ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS	V
LISTADO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS.....	VI
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	1
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. Situación problemática	3
1.2. Formulación del problema	4
1.3. Justificación de la investigación	5
1.4. Objetivos del estudio	6
II. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Antecedentes del problema.....	7
2.2. Bases teóricas.....	10
2.3. Marcos conceptuales	17
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES	
3.1. Hipótesis general.....	18
3.2. Identificación de variables	19
3.4. Operacionalización de variables	20
3.5. Matriz de consistencia.....	22
IV. METODOLOGÍA	23
4.1. Tipo de estudio.....	23
4.3. Población de estudio	23
4.4. Tamaño de muestra	23
4.5. Selección de muestra.....	23

4.6. Técnicas de recolección de datos	23
4.7. Análisis e interpretación de la información	25
4.8. Aspectos éticos	25
V. RESULTADOS.....	26
VI. DISCUSIÓN.....	38
VII. CONCLUSIONES	43
VIII RECOMENDACIONES.....	44
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
X. ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	26
TABLA 2.....	34
TABLA 3.....	35

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	27
GRÁFICO 2.....	28
GRÁFICO 3.....	29
GRÁFICO 4.....	30
GRÁFICO 5.....	31
GRÁFICO 6.....	32
GRÁFICO 7.....	33
GRÁFICO 8.....	36
GRÁFICO 9.....	37

LISTADO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

MINSA: Ministerio de Salud

INS: Instituto Nacional de Salud

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

DGE: Dirección General de Epidemiología

RENACE: Red Nacional de Epidemiología

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

HRM: Fusión de alta resolución (por sus siglas en inglés)

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (siglas en inglés)

MLEE: Electroforesis de enzimas multilocus (por sus siglas en inglés)

MA: Anticuerpos monoclonales (por sus siglas en inglés)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

GIS: Sistema de información geográfica

k-DNA: ADN del kinetoplasto

L. (V.): *Leishmania viannia*

L. (L.): *Leishmania leishmania*

LC: Leishmaniosis cutánea

LMC: Leishmaniosis mucocutánea

RESUMEN

En nuestro país la leishmaniosis representa un serio problema de salud pública. Existen zonas endémicas en costa, sierra y selva. La leishmaniosis es causada por un parásito del género *Leishmania* y se presenta clínicamente como leishmaniosis cutánea (LC) y leishmaniosis cutáneo-mucosa (LCM), de acuerdo a la especie involucrada.

Objetivo. Determinar la asociación entre la forma clínica y la especie de *Leishmania*, en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud. **Metodología.** Estudio observacional transversal. Se atendieron a 133 pacientes, que acudieron al Laboratorio de leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud durante el periodo 2006 – 2011, con diagnóstico confirmado de leishmaniosis e identificación de especie de *Leishmania* mediante la técnica de PCR-HRM, las cuales se analizaron con la forma clínica, en búsqueda de asociación usando la prueba de Chi cuadrado.

Resultados. De los 133 pacientes 95,5% presentan la forma clínica cutánea y el 4,5% la forma clínica cutáneo-mucosa. De las especies de *Leishmania* identificadas el 37% fue *L. (V.) guyanensis*, el 27% *L.(V.) peruviana*, el 14% *L. (V.) braziliensis*, el 12% *L.(V.) lainsoni* y el 10% *L. (L.) amazonensis*.

Conclusiones. Se encontró asociación entre la forma clínica (cutánea, cutáneo-mucosa) y especie de *Leishmania* infectante [$p = 0,04$].

L. (V.) peruviana y *L. (V.) lainsoni*, no presentaron la forma clínica cutáneo-mucosa. En tanto las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, presentaron formas cutáneas y cutáneo-mucosas.

Palabras clave: Especie de *Leishmania*, forma clínica, leishmaniosis.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a serious public health problem in our country. There are endemic areas in the coast, the highlands and the jungle. Leishmaniasis is caused by a parasite of *Leishmania* genus, and its clinical forms are cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL), according to the involved species.

Objective: To determine the association between the clinical forms and *Leishmania* species in patients diagnosed in the Leishmaniasis Laboratory of the Peruvian National Institute of Health.

Methodology: This is a cross-sectional observational study. One hundred and thirty-three patients who came to the Leishmaniasis Laboratory of the Peruvian National Institute of Health during the period 2006 - 2011 period, with a confirmed diagnosis of leishmaniasis and with the species identified using the PCR-HRM technique were assessed. The clinical forms were studied, looking for an association using the Chi-square test.

Results: Of the 133 patients assessed, we found 95.5% with the cutaneous clinical form and 4.5% had the mucocutaneous clinical form. The *Leishmania* species identified were as follows: *L. (V.) guyanensis*, 37%; *L. (V.) peruviana*, 27%; *L. (V.) braziliensis*, 14%; *L. (V.) lainsoni*, 12%; and *L. (V.) amazonensis*, 10%.

Conclusions: An association was found between the clinical form (cutaneous, mucocutaneous) and the infecting *Leishmania* species [$p= 0.04$]. *L. (V.) peruviana* and *L. (V.) Lainsoni* did not show the mucocutaneous clinical form. And the following species: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, and *L. (V.) amazonensis*, presented both the cutaneous and mucocutaneous forms.

Keywords: *Leishmania* species, clinical form, leishmaniasis.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis pertenece al grupo de enfermedades zoonóticas distribuidas en todo el mundo, esta enfermedad es causada por protozoos del género *Leishmania*, los cuales se transmiten por insectos del género *Flebotomus* y *Lutzomya*. Esta enfermedad tropical se extiende en más de 98 países endémicos del mundo y existen más de 350 millones de personas en riesgo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima una incidencia de 2 millones de nuevos casos por cada año (0,5 millones de la leishmaniosis visceral) y 1,5 millones de leishmaniosis cutánea. En las Américas, las zonas endémicas de leishmaniosis se extienden desde México a la Argentina. Sin embargo, los datos oficiales subestiman la realidad de la afección humana por dichos protozoarios, debido a que gran parte de la información se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva, numerosos casos no son diagnosticados, por lo que existe un gran número de personas asintomáticas. Esta parasitosis puede ser causada por muchas especies de *Leishmania*, la mayoría de las cuales son zoonóticas, según la OMS 2010, Alvar J. (2012), Reveiz L. (2013).

Se presenta una variedad de manifestaciones clínicas que incluye: leishmaniosis cutánea (LC), la leishmaniosis cutáneo mucosa (LCM) con características de una enfermedad mutilante, leishmaniosis visceral (LV), que es la forma más agresiva de la enfermedad, y leishmaniosis cutánea difusa (LCD) es una enfermedad de larga duración, según Desjeux, (2004); Dujardin, (2008); OMS (2010)

En el Perú, la leishmaniosis es un serio problema de salud pública, existen zonas endémicas con alta prevalencia en costa, sierra y selva. La leishmaniosis cutánea (LC), se manifiesta de manera variable como úlceras, pápulas, nódulos, lesiones verrucosas o plaqueiformes que pueden causar estigmas estéticos importantes y en la leishmaniosis mucosa se manifiesta con lesiones mutilantes en cavidad oral y nasal. Por estos motivos, tanto la leishmaniosis cutánea (LC) y la leishmaniosis cutáneo-mucosa (LCM), pueden generar aislamiento del paciente de su entorno, debido a la discriminación social que sufre. Estas manifestaciones clínicas dependen de muchos factores como el estado de salud, la genética del hospedero y su capacidad de respuesta inmunológica hacia el parásito. Según Sánchez L. (2004) y Pérez JE. (2007).

En un estudio realizado con muestras de 73 pacientes con diagnóstico de leishmaniosis, se observaron ocho pacientes con lesiones mucocutáneas causadas por *L. (V.) braziliensis*, y 65 pacientes con lesiones cutáneas ocasionadas por *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) guyanensis* según Fraga J. (2010). El presente estudio buscó determinar si existe asociación entre la forma clínica y la especie de *Leishmania* identificada mediante la técnica de PCR-HRM, en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Situación problemática

La leishmaniosis sigue siendo una de las enfermedades más desatendidas en todo el mundo, por lo que se considera un problema grave de salud pública y afecta predominantemente a los más pobres, hay 350 millones de personas en riesgo de contraerla y cada año se producen 2 millones de casos nuevos. Esta enfermedad es causada por parásitos que pertenecen al género *Leishmania* y transmitida por vectores del género *Phlebotomus* y *Lutzomya*. Esta parasitosis tiene una variedad de manifestaciones clínicas, que van desde lesiones cutáneas, o mucosas a forma graves como la visceral, que puede desencadenar la muerte del paciente. En las Américas se observa una amplia gama de manifestaciones clínicas, causadas por múltiples especies de *Leishmania* filogenéticamente distintas. Aunque algunas de esas manifestaciones, se asocian con más frecuencia a alguna especie o subgénero en particular, ninguna es exclusiva de una especie, según OMS 2010, Alvar J. (2012).

La leishmaniosis tegumentaria americana es endémica en América central y América del Sur, con excepción de Chile. En el Perú existen zonas endémicas en costa, sierra y selva, donde se presenta con frecuencia, una alta prevalencia de casos de leishmaniosis. Así, observamos que el promedio de casos de leishmaniosis cutánea durante el 2000 al 2015 fue de 5621; y de 1432 casos hasta la semana 18 del año 2016 y de leishmaniosis mucocutánea el promedio de casos fue de 412 en los años 2000 al 2015 y de

85 casos hasta la semana epidemiológica 18 del año 2016, según el Centro Nacional de Epidemiología (2016).

Al Laboratorio Referencial Nacional de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud, acuden pacientes de los diferentes lugares endémicos del Perú, para realizar pruebas de laboratorio convencionales y moleculares para el diagnóstico de leishmaniosis. Creemos que es muy importante realizar, la identificación de especie de *Leishmania*, de cada paciente infectado, sabemos que las manifestaciones clínicas dependen de muchos factores como el estado de salud, la genética del hospedero y su capacidad de respuesta inmunológica hacia el parásito, según OPS (2002) y Sánchez L. (2004). En las zonas endémicas de nuestro país, los pacientes infectados han presentado diversas manifestaciones clínicas y según la casuística de los reportes del Centro Nacional de Epidemiología, tanto la leishmaniosis cutánea como cutáneo-mucosa, solamente son diagnosticados mediante el examen directo y no se realiza la identificación de la especie de *Leishmania*, por lo que en este estudio se buscó determinar si existe asociación entre la forma clínica y la especie de *Leishmania* determinada mediante la técnica de PCR-HRM, en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud.

1.2. Formulación del problema

¿Existe asociación entre la forma clínica y la especie de *Leishmania* determinada mediante la técnica de PCR-HRM, en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud 2006 - 2011?

1.3. Justificación de la investigación

En el Perú, la leishmaniosis es endémica en el 74% del territorio nacional, con un incremento alarmante de casos en los últimos 14 años. Existen zonas endémicas en áreas tropicales de la costa, sierra y selva; en dichos lugares la prevalencia es alta, debido a muchos factores, como climatológicos y las actividades económicas extractivas de la población principalmente la agricultura, minería y extracción de madera, acciones que permiten el ingreso del hombre al hábitat del vector, lo cual incrementa el riesgo de infección. Vemos que el promedio de casos de leishmaniosis cutánea desde el 2000 al 2015 fue 5621 y leishmaniosis cutáneo-mucosa 412 casos y para el año 2016, hasta la semana 18, se presentaron 1432 casos de leishmaniosis cutánea y para leishmaniosis cutáneo-mucosa 85 casos en todo el país, siendo los departamentos de San Martín, Cusco, Cajamarca, Piura, Junín, Ancash, Lima, Amazonas, La Libertad y Madre de Dios quienes tuvieron más casos, según el Centro Nacional de Epidemiología (2016).

Existen las formas cutáneas y la cutáneo-mucosa, que son endémicas en los departamentos de Ancash, Ucayali, Junín, Loreto, San Martín, Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Cerro de Pasco y Madre de Dios. En los Andes predomina la especie *L. (V.) peruviana* y mientras que en la Amazonía la mayoría de los casos son causados por *L. (V.) braziliensis*, ocasionalmente, por *L. (V.) guyanensis*, *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) shawi*, según Hiroto K. (2010) y Urbano J. (2011).

Según estudios realizados por Arévalo J. (2007) y Llanos-Cuentas (2008), donde se debate sobre el importante papel de las especies de *Leishmania*, sostienen que pueden influir en la respuesta terapéutica a los antimoniales

observados en Perú y Brasil. Por lo tanto, la identificación del parásito es de máxima importancia clínica, ya que debería conducir a un tratamiento orientado por especies. Por ello, se consideró necesario realizar el presente estudio para determinar la probable asociación existente entre la especie del parásito y la forma clínica, de modo que se establezca, en la nueva Norma Técnica de Diagnóstico y Tratamiento de la Leishmaniosis Cutánea y Cutáneo-mucosa del Perú, la identificación de especie de *Leishmania* infectante, como prueba de laboratorio de rutina y se implemente en los establecimientos de salud de las zonas endémicas de nuestro país, con el fin de tener una predicción a un tratamiento adecuado, conociendo el tipo de especie y la clínica del paciente infectado, por consiguiente disminuir la falla al tratamiento con antimoniales, o realizar terapias combinadas en beneficio del paciente infectado con *Leishmania*, todo esto es importante para mejorar las políticas de salud pública en nuestro país en relación a la leishmaniosis.

1.4. Objetivos de estudio

1.4.1. Objetivo general

Determinar si existe asociación entre la forma clínica y la especie de *Leishmania*, identificada mediante la técnica de PCR-HRM, en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud 2006 - 2011.

1.4.2. Objetivos específicos

- Identificar las especies de *Leishmania* mediante la técnica de PCR-HRM, en los pacientes con diagnóstico de leishmaniosis atendidos en

el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud 2006 - 2011.

- Describir las formas clínicas de los pacientes con infección por *Leishmania*, atendidos en el Instituto Nacional de Salud durante los años, 2006 - 2011.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del problema

Un estudio en Colombia que incluyó 151 aislamientos provenientes de casos de la costa del Pacífico, detectó la presencia de variantes de *L. panamensis* (82%), *L. (V.) braziliensis* (14,5%) y fenotipos intermediarios comprendidos entre *L. panamensis* y *L. guyanensis* (3,5%). Se ha demostrado que la afección de la mucocutánea guarda asociación con *L. braziliensis* y *L. panamensis*, pero en el caso de *L. braziliensis* la frecuencia y gravedad es mayor, según OPS (2002).

En los 23 casos contraídos en la provincia de Salta en Argentina la especie predominante fue *L. (V.) brazilienses* con 19 casos, esta especie fue la causante de todos los casos severos de leishmaniosis (lesiones mucocutáneas y una con enfermedad diseminada). La otra especie fue *L. (L.) amazonensis* con cuatro casos, estas presentaron solo lesiones cutáneas según Barrio A. (2009).

Según un estudio realizado en una zona endémica de Amazonas en Brasil, donde existe una amplia variabilidad clínica debido a la gran diversidad de especies circulantes en dicha región, se encontraron *Leishmania* (V)

guyanensis, el 73% (153 /209); *Leishmania* (V) *braziliensis*, el 14% (30/209); *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, 8% (17/209), y *Leishmania* (V) *naiffii*, 4% (9/209). De las cuales se observó que La especie más predominante fue *L. (V.) guyanensis*, las cuales se tomaron de pacientes con una sola lesión, según Camara L. (2011).

Un estudio realizado en el estado de Amazonas de Brasil, donde se observa que la leishmaniosis mucosa, es causada predominantemente por *L. (V.) braziliensis*, mientras que en la región amazónica, tanto *L. (V.) braziliensis* y *L.(V.) guyanensis* se encuentran causando la leishmaniosis cutánea y mucosa. Las infecciones humanas se observan en personas que realizan actividades relacionados con la extracción forestal, tales como la deforestación, la construcción de carreteras, la extracción de petróleo, y las expediciones científicas. Este estudio demuestra que de los 192 pacientes que tenían leishmaniosis cutánea, 112 (63,5%) tenía falla al tratamiento de las lesiones cutáneas. Además, se demuestra que múltiples o extensas lesiones cutáneas de larga duración más frecuentemente se asocia con complicaciones de la mucosa, según Camara L. (2011).

En Colombia, la leishmaniosis se presenta en forma endémica y se encuentra en el 91% de todo el territorio ubicado bajo los 1750 m de altitud; además, produce las tres formas clínicas principales de la enfermedad, es decir, la mucosa, visceral y cutánea. Los focos se encuentran en una gran diversidad de regiones naturales que incluyen zonas selváticas del bosque seco tropical como la costa del Caribe. Se ha demostrado la presencia de seis especies de *Leishmania*. Esta diversidad de especies de parásitos y vectores hace más compleja la caracterización ecoepidemiológica y el control de la enfermedad

en el país. En este estudio, se observó que las formas clínicas y las especies de *Leishmania* involucradas en la Leishmaniosis cutánea fue producida por *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) amazonensis*. La leishmaniosis mucocutánea fue producida por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, y Leishmaniosis visceral causada por *L. (L.) chagasi*, según Romero M. (2007). Otros estudios reportan que la *L. (V.) braziliensis* causó una variedad de lesiones clínicas mucosas y la mayoría de los pacientes tenían una lesión ulcerada, más comúnmente en las extremidades superiores e inferiores, según Falqueto A. (2003), Schrieffer A. (2004) y Grizzo A.L. (2014).

En el Perú se han reportado seis especies causantes de la leishmaniosis, así tenemos *Leishmania (V.) brasiliensis*, es el agente principal de leishmaniosis mucocutánea y *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (L.) amazonensis* y *Leishmania (L.) mexicana* principales agentes de leishmaniosis cutánea *L.*, también se encontró *L. (L.) amazonensis* aislada en lesiones cutáneas localizadas, mucocutáneas y formas cutáneas difusas, según Arévalo J. (2007), García AL.(2007), Pérez JE (2007) y Fraga J. (2012).

En estudios realizados en Brasil, reportan a *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis*, como las más prevalentes y causantes de leishmaniosis cutánea. La *L. (V.) guyanensis* se asocia con el ciclo selvático, en el cual los seres humanos perturban el vector en el bosque, es decir está relacionado con la exposición ocupacional. La infección causada por *L. (V.) braziliensis* se caracteriza por un cuadro clínico que va desde una ulcera cutánea localizada que afecta a la piel expuesta, por lo general los miembros inferiores y se

asocia a menudo con inflamación de los ganglios linfáticos con adenomegalia satélite, según Romero G. (2001) y Tojal A. (2006).

2.2. Bases Teóricas

2.2.1 Leishmaniosis aspectos epidemiológicos clínicos

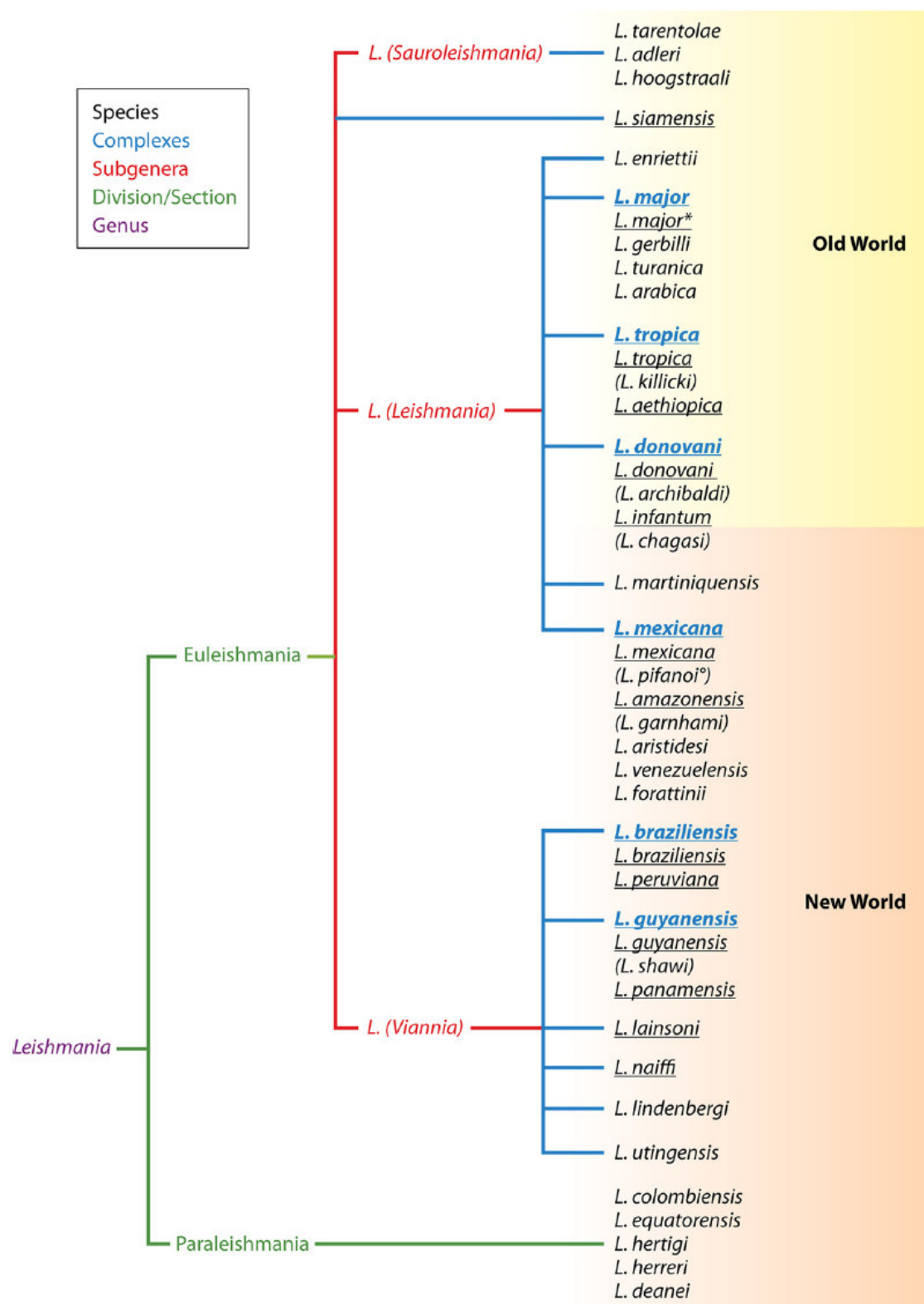
La leishmaniosis, es un obstáculo para el desarrollo socioeconómico pues afecta aproximadamente a 12 millones de personas en 98 países, con una incidencia global anual de 700 000 a 1 200 000 casos para la forma cutánea mientras que para la forma visceral es de 200 000 a 400 000 casos; en la actualidad existe una estimación de 20 000 a 40 000 muertes debido a leishmaniosis por año a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido a esta enfermedad como un problema de salud pública, situándola como una de las seis primeras enfermedades parasitarias de importancia a nivel mundial, según OMS (2010) y Alvar J. (2012).

En estudios realizados se han encontrado que varias especies y complejos de especies, forman entidades separadas que son claramente diferentes de todos los demás, esto se aplica a *L. siamensis*, *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* y *L. naiffi* (Figura 1).

La actual clasificación de *Leishmania* no es totalmente coherente, aunque discriminarlas es clínicamente y epidemiológicamente relevante. La taxonomía se ve afectada por formas intermedias entre parásitos estrechamente relacionados, como los que existen entre *L. braziliensis* y *L. peruviana*, y otros pueden representar formas de transición remanentes del proceso de especiación o híbridos interespecies. Tales formas complican la

clara distinción entre especies, lo que también conduce a dificultades en el proceso de tipificación de especies.

Fig. N° 1



Algunas especies han sido relacionadas a formas clínicas específicas, como es el caso de la *L. braziliensis* y *L. guyanensis* que se presentan como leishmaniosis cutánea o mucocutánea, mientras que *L. peruviana*, *L. lainsoni* producen solo leishmaniosis cutánea y *L. amazonensis* causa leishmaniosis diseminada o cutáneo difusa, según Cantanhêde LM, (2015).

En las Américas se observa una amplia gama de manifestaciones clínicas causadas por múltiples especies de *Leishmania* filogenéticamente distintas. Aunque algunas de esas manifestaciones se asocian con más frecuencia a alguna especie o subgénero en particular, ninguna es exclusiva de una especie. Además, hay una proporción considerable, pero variable, de infecciones asintomáticas. Las formas clínicas son las leishmaniosis cutáneas y mucocutáneas localizadas, diseminadas, difusas y atípicas, según OPS (2002).

La leishmaniosis cutánea localizada es causada por múltiples especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, cuya prevalencia es variable dentro de la región de las Américas. Las lesiones pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo y, generalmente, se originan en el punto de inoculación como una mácula seguida de una pápula que se ulcera y extiende para formar una lesión crateriforme redondeada u ovalada típica, o bien evolucionan como lesiones nodulares. Las lesiones pueden aparecer semanas, meses o incluso años después de la infección. Las lesiones primarias pueden ser únicas o múltiples. La afectación linfática se manifiesta por linfadenitis o linfadenopatías, y es frecuente en las lesiones causadas por especies del subgénero *Viannia*. Las lesiones causadas por *L. mexicana* suelen curarse espontáneamente en 3 a 4 meses, mientras que las causadas por las

especies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana* del subgénero *Viannia* pueden curarse sin tratamiento pasados 6 meses. Puede haber lesiones cutáneas o mucosas, según Arenas R. (2005).

La interacción entre *Leishmania* y la respuesta del huésped humano se manifiesta no solo por el desenlace clínico o subclínico de la enfermedad, sino también por las tasas de curación espontánea y de recurrencia. Las respuestas inmunitarias tanto excesivas como deficientes pueden conducir a presentaciones crónicas de la enfermedad, desde el punto de vista terapéutico. La leishmaniosis cutánea difusa no ulcerosa se caracteriza por una ausencia de reactividad específica contra la leishmania mediada por células; la inmunodepresión mediada por la infección durante la leishmaniosis visceral deja al huésped indefenso ante una carga masiva de parásitos, y el aumento de la hipersensibilidad mediada por células produce enfermedad cutánea y mucosa crónica desfigurante. A pesar de que ya había pruebas clínicas, la función de la respuesta inmunitaria se estableció inequívocamente cuando se lograron invertir los fenotipos sensibles y resistentes en modelos experimentales definidos genéticamente, según OMS (2010).

La leishmaniosis cutánea produce usualmente solo lesiones cutáneas. Sin embargo, las membranas mucosas pueden estar ocasionalmente comprometidas, directamente relacionadas a la contigüidad de una lesión con la mucosa, en el caso de lesiones producidas en la cara, las especies de *Leishmania* infectante y la respuesta inmune del huésped determinan las características clínicas y la cronicidad de las lesiones, así, tenemos que las lesiones causadas por *L. (L) mexicana* tienden a ser pequeñas y menos crónicas que las causadas por *L. (V) braziliensis*. La *L. (V) peruviana*

presenta, principalmente, formas papulofoliculares y nodulares dérmicas; en la leishmaniosis causada por *L. (V) braziliensis* predomina la forma ulcero franca; la leishmaniosis por *L. (V) guyanensis* origina úlceras múltiples; la *L. (V) panamensis* produce lesiones ulcerosas y la *L. (L) amazonensis* tiende a producir leishmaniosis cutáneo difusa, la *L. (V) lainsoni* produce principalmente lesiones cutáneas, según Sánchez L. (2004).

Como el viaje a América Latina se ha convertido cada vez más común, la leishmaniosis cutánea es considerada una enfermedad del viajero, así observamos un porcentaje sorprendentemente alto de casos adquiridos en las zonas rurales o en la selva de la cuenca amazónica en Bolivia, en donde se observaron manifestaciones clínicas como lesiones cutáneas ulcerosas y muchos casos con complicación de la mucosa ocasionando leishmaniosis mucocutánea, causada por *Leishmania (Viannia) brazilienses*, según Schwartz E. (2006).

La leishmaniosis causada por *L. (V) guyanensis* causa múltiples úlceras, que sin tratamiento pueden extenderse por la cadena linfática de forma similar a la esporotricosis; en un porcentaje bajo muestra tendencia a la forma mucocutánea. La *L. (V) panamensis* produce lesiones ulcerosas que no tienden a la curación espontánea y afectación linfática en forma de rosario. La leishmaniosis producida por la *L. (L) amazonensis* rara vez produce enfermedad en el hombre y tiende a producir leishmaniosis cutánea difusa resistente a la curación. La *L. (V) lainsoni* produce principalmente lesiones cutáneas, según OMS (2010) y Tsukayama P (2013).

Según el estudio realizado en Brasilia, se observaron lesiones múltiples en pacientes infectados con *L. (V.) braziliensis* los cuales se relacionaron con la

forma diseminada que representa un síndrome especial, con peculiar respuesta al tratamiento debido a un perfil particular, inmunopatológicos, y *L.(V.) guyanensis* indujo una respuesta inmunitaria retardada similares a la observada durante la enfermedad causada por *L. (V.) braziliensis*. También se detectó una respuesta precaria al Antimonial pentavalente en pacientes infectados con *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) braziliensis*, según Sierra G, (2001).

2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa con el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM)

Para la identificación de las especies de *Leishmania* actualmente se ha demostrado, que existen varias técnicas moleculares, las cuales son efectivas. En particular, se han desarrollado varios métodos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sobre varias secuencias de ADN incluyendo regiones constantes de minicírculo de kinetoplastos.

Según estudios realizados por Ceccarelli M y col. (2014), en 62 muestras clínicas caninas, se desarrolló un ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con SYBR Green, de *Leishmania (Leishmania) infantum* y también se evaluó la posibilidad de discriminar la diferencia entre los subgéneros *Leishmania (Leishmania)* y *Leishmania (Viannia)*, utilizando el ensayo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguido de análisis de fusión de alta resolución (HRM), el cual ha demostrado ser capaz de discriminar, entre los subgéneros de *Leishmania (Leishmania)* y *Leishmania (Viannia)*, confirmando los resultados obtenidos previamente en cepas brasileñas, y diferenciando las cepas de referencia *L. (L.) infantum* de *L. (L.) amazonensis*.

Se realizó una prueba molecular de alta resolución de fusión (HRM), este ensayo fue dirigido a los marcadores de HSP70 y ITS1. Para esto se diseñaron cebadores específicos para el análisis de fusión de alta resolución (HRM), el cual permitió discriminar seis especies de *Leishmania* del nuevo mundo (*L. mexicana*, *L. infantum (chagasi)*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. braziliensis*). Cuando se aplicó el algoritmo a un conjunto de cepas bien caracterizadas mediante las diferentes pruebas moleculares como son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y los anticuerpos monoclonales (MA), se observó una concordancia del 100%, entre la PCR-HRM y PCR-RFLP, MLEE, MA obteniéndose un índice kappa igual a 1. Otra característica importante de este ensayo, además de su reproducibilidad fue la sensibilidad del método que es capaz de detectar al menos 10 parásitos / mL y por lo tanto se considera un valor alto de sensibilidad. La reacción en cadena de la polimerasa con el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM), también se caracteriza porque en este análisis, no hay necesidad de secuenciación o fraccionamiento de gel para analizar el producto, evitando así la contaminación de laboratorio con productos de PCR, porque estos residuos se descartan sin manipulación. También reduce la necesidad de personal entrenado para analizar el perfil de fraccionamiento de un gel electroforético o datos de secuenciación para proporcionar un resultado. El ensayo de fusión de alta resolución (HRM), presenta una posibilidad de cuantificar los parásitos presentes en las muestras porque se trata de una técnica basada en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Además, todo el

proceso puede ser automatizado. Porque el software del analizador producirá el resultado comparando las muestras de estudio con los controles de referencia, las cuales deben ser siempre incluidas en las reacciones. Por lo tanto, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM), se trata de un método rápido y fiable para llevar a cabo en epidemiología molecular y estudios de asociación huésped-parásito en áreas endémicas. Estas ventajas demuestran que este método tiene un alto potencial para la identificación de especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo y es una opción adecuada para la identificación y caracterización, según Hernandez C, (2014) y Zampieri RA, (2016).

2.3. Marco conceptual o glosario

Procedencia: zona donde se presume que ocurrió el contagio de la enfermedad.

Zona endémica: lugar donde existe la presencia constante de casos de leishmaniosis.

Leishmaniosis: es un grupo de enfermedades parasitarias zoonóticas, producidas por diferentes especies de protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania*.

Caso confirmado de leishmaniosis: frotis, cultivo, histopatología o PCR positivo, para la detección de parásitos de *Leishmania*.

Leishmaniosis cutánea: presencia de lesiones en la piel, con frotis y/o cultivo positivo.

Leishmaniosis mucocutánea: se caracteriza por producir metástasis en la mucosa nasal, oral y/o faríngea con frotis, cultivo y/o PCR positivo.

Úlcera: toda lesión abierta de la piel o membrana mucosa con forma crateriforme (forma de un cráter, al perderse parte del tejido).

Nódulo: protuberancias elevadas y sólidas en la piel o debajo de esta que miden más de 10 mm de ancho aproximadamente.

Ganglio linfático: formaciones nodulares de tamaño variable (desde 2 mm de diámetro) que forman parte del sistema linfático. Se estructuran en red y están intercomunicados y distribuidos por todo el cuerpo.

Verruga: lesiones que presentan una forma variable, excrecente y a veces de chocante apariencia, generalmente de forma globular, que pueden afectar a distintas zonas de la piel.

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. Hipótesis general

Existe asociación entre la forma clínica y la especie de *Leishmania* en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud.

3.2. Hipótesis específica

La leishmaniosis cutáneo-mucosa se asocia con *Leishmania (Viannia) braziliensis* y la leishmaniosis cutánea se asocia con la especie de *Leishmania (Viannia) peruviana*, en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud, identificando las especies mediante la técnica de PCR-HRM.

3.3. Identificación de variables

VARIABLE DEPENDIENTE

Forma clínica: cutánea y cutáneo-mucosa

VARIABLE INDEPENDIENTE

Especie de *Leishmania*

COVARIABLES

Edad

Sexo

Procedencia

Ocupación

Tiempo de la enfermedad

Número de lesiones

Tipo de lesiones

Localización de lesiones; superficie total comprometida

3.4. Operacionalización de variables

Variable	Definición teórica	Fuente	Valores	Tipo de variable	Escala
Forma clínica	Tipo de forma clínica que presenta el paciente.	Ficha epidemiológica	Cutánea Cutáneo-mucosa	Cualitativa	Nominal
Especie de <i>Leishmania</i>	Parásitos intracelulares localizados dentro de macrófagos del sistema retículoendotelial, identificada mediante la técnica de PCR-HRM.	Resultado del examen de PCR-HRM.	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> <i>Leishmania (V.) peruviana</i> <i>Leishmania (V.) guyanensis</i> <i>Leishmania (V.) lainsoni</i> <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> <i>Leishmania (L.) mexicana</i>	Cualitativa	Nominal
Edad	Años de vida de la persona	Ficha epidemiológica	≤ de 17 años 18 – 24 25 – 64 ≤ 65	Cuantitativa	Razón
Sexo	Sexo del paciente	Ficha epidemiológica	Masculino Femenino	Cualitativa	Nominal
Procedencia del paciente	Zona endémica de leishmaniosis donde se presume que ocurrió el contagio	Ficha epidemiológica	Andina Selvática	Cualitativa	Nominal
Ocupación	Oficio que cada persona tiene o ejerce	Ficha epidemiológica	Agricultor, maderero, minero, estudiante, su casa, otros.	Cualitativa	Nominal
Tiempo de la enfermedad	Duración de enfermedad en días desde que el paciente percibe la	Ficha epidemiológica	< 1 mes 1 a 2 meses	Cuantitativa	Razón

Asociación entre cuadro clínico y especie de *Leishmania* spp, en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Salud, 2006 – 2011

Variable	Definición teórica	Fuente	Valores	Tipo de variable	Escala
	lesión		3 a 6 meses > 6 meses		
Número de lesiones	Cantidad total de lesiones en el cuerpo del individuo	Ficha epidemiológica	1 lesión 2 lesiones 3 lesiones > 3 lesiones	Cuantitativa	Razón
Tipo de lesiones	Características morfológicas de las lesiones encontradas en la ficha.	Ficha epidemiológica	Ulcerativa, nodular, proliferativa, infiltrativa	Cualitativa	Nominal
Localización de lesiones	Ubicación corporal de la lesión	Ficha epidemiológica	CUTANEA: Cara, espalda, tronco, extremidades superiores, extremidades inferiores, pabellón auricular, cuello, otras. CUTÁNEO-MUCOSA: Nariz, cavidad oral, faringe, otras.	Cualitativa	Nominal
Superficie total comprometida	Suma total del área calculada en milímetros cuadrados de las lesiones	Examen clínico	menor de 10 x 10 mm de 10 x 10 mm a 20 x 20 mm mayor 20 x 20 mm a 30 x 30 mm mayor de 30 x 30 mm	Cuantitativa	Razón

3.5. Matriz de consistencia

Problema	Objetivo general	Hipótesis	Variables	Técnicas recolección datos
¿Hay asociación entre la forma clínica y especie de <i>Leishmania</i> , determinada mediante la técnica de PCR-HRM, en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud 2006 - 2011?	Determinar si existe asociación entre la forma clínica y la especie de <i>Leishmania</i> identificada mediante la técnica de PCR-HRM, en pacientes atendidos en el laboratorio del Instituto Nacional de Salud 2006 - 2011.	Existe asociación entre la forma clínica y especie de <i>Leishmania</i> en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud.	<ul style="list-style-type: none"> • Forma clínica • Tipo de <i>Leishmania</i>. • Edad • Sexo • Procedencia 	<ul style="list-style-type: none"> • Fichas epidemiológicas • Resultados de PCR.
Problema específico	Objetivo específico	Hipótesis específicas	Probable lugar de contagio	
¿Cuáles son las especies de <i>Leishmania</i> más frecuentes en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud 2006 - 2011?	<ul style="list-style-type: none"> • Identificar las especies de <i>Leishmania</i> mediante PCR-HRM, en pacientes atendidos en el laboratorio del Instituto Nacional de Salud 2006 – 2011. • Describir las características clínicas de los pacientes con infección por <i>Leishmania</i> atendidos en el laboratorio del Instituto Nacional de Salud 2006 - 2011. 	<ul style="list-style-type: none"> - La leishmaniosis cutáneo-mucosa se asocia con <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> y la leishmaniosis cutánea se asocia con la especie de <i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>, en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud, identificando las especies mediante la técnica de PCR-HRM. -La forma clínica de los pacientes con infección por <i>Leishmania</i> atendidos en el laboratorio del Instituto Nacional de Salud más frecuentes son las lesiones cutáneas ulcerativas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de la enfermedad • Número de lesiones • Tipo de lesiones • Localización de lesiones 	
¿Cuáles son las características clínicas de leishmaniosis más frecuentes en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud 2006 - 2011?				

IV. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de estudio

Observacional transversal

4.2 Unidad de análisis

Paciente con Leishmaniosis Tegumentaria según especie de *Leishmania* identificada.

4.3 Población de estudio

Pacientes con diagnóstico leishmaniosis que cuenten con resultado de identificación molecular de la especie de *Leishmania* por reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM), que acudieron al Laboratorio de leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud durante el periodo 2006 – 2011.

Criterio de inclusión

Pacientes que cuenten con registro completo de la ficha epidemiológica y el resultado de identificación de especie de *Leishmania* por PCR-HRM.

Criterio de exclusión

Pacientes con registro incompleto de la ficha epidemiológica y no cuente con resultado de identificación de especie de *Leishmania* por PCR-HRM.

4.4. Tamaño de muestra

Por conveniencia. Se incluyeron en el presente estudio 133 pacientes de acuerdo a los criterios de inclusión.

4.5. Selección de muestra

No aplica, se incluyeron a todos los pacientes con diagnóstico de leishmaniosis e identificación molecular de la especie de *Leishmania*, mediante la PCR-HRM, que acudieron al Laboratorio de leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud durante el periodo 2006 – 2011.

4.6. Técnicas de recolección de datos

4.6.1. Recolección de datos

Este estudio se enmarcó dentro de las actividades de vigilancia de leishmaniosis que acudieron al INS para la confirmación diagnóstica por laboratorio.

Para el registro de datos se utilizó la ficha epidemiológica de Leishmaniosis del Manual de Procedimientos de Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud, las cuales fueron llenadas por el personal de salud, encargado de evaluación clínica al paciente previo a la toma de muestra.

4.6.2. Análisis de PCR

- **Recolección de muestras y mantenimiento**

Las muestras se obtuvieron en las instalaciones de toma de muestras del Instituto Nacional de Salud.

Para la obtención de la muestra se cumplió con los procedimientos establecidos en el Manual de procedimientos del Laboratorio de Leishmaniosis del INS.

El diagnóstico por laboratorio de la leishmaniosis tegumentaria se realizó mediante visualización directa del parásito en el frotis y el aislamiento mediante cultivo in vitro en medio bifásico de agar sangre de conejo. Las cepas aisladas fueron criopreservadas a -80°C.

- **Extracción de ADN a partir de cultivos de parásitos**

Las cepas de los parásitos fueron descongeladas y luego se realizó los lavados por dos veces con solución salina fisiológica al 0,89% y centrifugados a 8000 rpm durante 10 min, luego se extrajo el ADN de kinetoplasto según metodología descrita por el protocolo de QIAamp DNA, cuantificado con espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) y se ajustó a una concentración de 10 ng/uL de ADN, según QIAGEN (2007).

- **Identificación de especies mediante PCR-HRM**

El análisis de High Resolution Melting (HRM), según Ruskova L, se realizó mediante el protocolo modificado para la PCR en tiempo real, para la reacción de 10 uL fueron; 2 uL de ADN, 0,7 uM de primers OL 1: 5'-GGG GGG GAG CGT TCT GCG AA 3' y OL2: 5'-CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3' y 1X de tinta intercalante Eva Green (Kit Tipe-it HRM PCR; Qiagen), el tiempo real de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 5 min seguido de 35

Asociación entre cuadro clínico y especie de *Leishmania* spp, en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Salud, 2006 – 2011

ciclos con desnaturalización a 95 °C x 10 s, alineamiento a 55 °C por 30 s, y una extensión a 72 °C por 10 s, después se sometió a un aumento de temperatura de 1 °C en el rango de 65 °C a 90 °C, para la desnaturalización de la doble cadena de una sola hebra, y disociación del colorante de intercalación de la doble hebra en el termociclador modelo Rotor-Gene 6000 real time. El post análisis de las curvas de disociación para la identificación de especies de *Leishmania* se desarrolló en Rotor Gene Q *Software v 2.1.0* con valores normalizados entre 65 - 66 y 89 – 90, según Hernández C. (2014), Rojas-Palomino N. (2015) y Zampieri RA. (2016).

4.6.3. Georeferenciación de especies mediante el QGIS 2.4

Mediante el sistema de información geográfica *Quantum GIS 2.4* (2014) se realizó la georreferenciación de los casos en el mapa del Perú, utilizando las coordenadas del lugar de procedencia del paciente.

4.7. Análisis e interpretación de la información

El análisis de datos fue realizado usando estadística descriptiva de donde se obtuvo frecuencias absolutas y relativas, así como medias y desviación estándar para las variables cualitativas y cuantitativas respectivamente, para señalar qué especie es la que se presenta para cada caso y la asociación con el cuadro clínico, para el análisis se usó la prueba de chi cuadrado tomando como nivel de significancia estadística un ($p < 0,05$), los resultados fueron analizados con el programa STATA 12.

4.8. Aspectos éticos

La presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Salud, en el marco de los proyectos aprobados por el Laboratorio de Leishmaniosis del INS - 2013.

V. RESULTADOS

5.1 Presentación de resultados

Durante el periodo 2006 al 2011, el Laboratorio de Leishmaniosis del INS realizó la atención a pacientes con leishmaniosis tegumentaria que acudieron para la confirmación del diagnóstico por laboratorio.

Se seleccionaron a 133 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión del presente estudio obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 1. Características sociodemográficas de 133 pacientes con leishmaniosis que acudieron al INS durante el 2006 – 2011

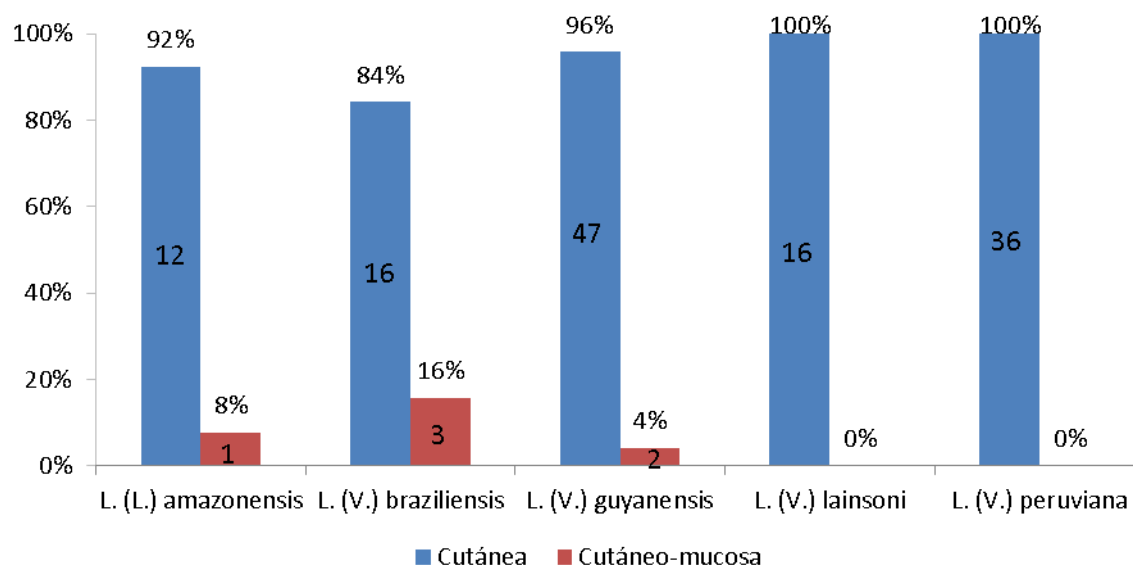
Variable	Categoría	Número	%
Edad	≤ de 17 años	38	28,6
	18 – 24	51	38,3
	25 – 64	32	24,1
	≥ 65	12	9,0
Sexo	Femenino	47	35,3
	Masculino	86	64,7
Ocupación	Actividad Extradomiciliaria*	74	63,2
	Actividad Intradomiciliaria †	49	36,8

* Agricultor, pescador, maderero, minero, estudiante, militar.

† Ama de casa.

Observamos las características sociodemográficas de los 133 pacientes con diagnóstico confirmado a leishmaniosis que acudieron al Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud donde nos muestran que el 64,7 % pertenece al sexo masculino, el 38,3% pertenece al grupo etario de 18 a 24 años y el 63,2 % fue paciente con ocupación de actividades extradomiciliaria.

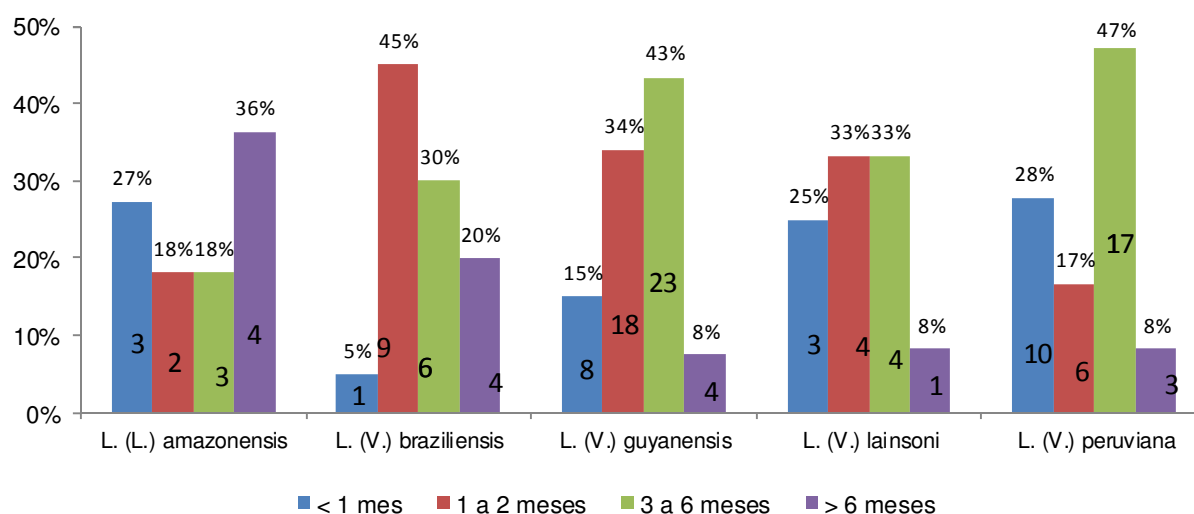
Gráfico 1. Forma clínica de las lesiones según especie de *Leishmania*, Instituto Nacional de Salud, Años 2006-2011



En el gráfico observamos que la presentación clínica predominante es la cutánea en todas las especies en relación con la forma clínica cutáneo – mucosa. En las lesiones causadas por *L. (V.) lainsoni* y *L. (V.) peruviana*, la presentación cutánea es en la totalidad de los casos.

El mayor porcentaje de presentaciones mucocutáneas las tenemos con la especie *L. (V.) braziliensis*, seguida de las producidas por *L. (V.) amazonensis*.

Gráfico 2. Tiempo de evolución de lesiones según especie de *Leishmania*, Instituto Nacional de Salud, Años 2006-2011



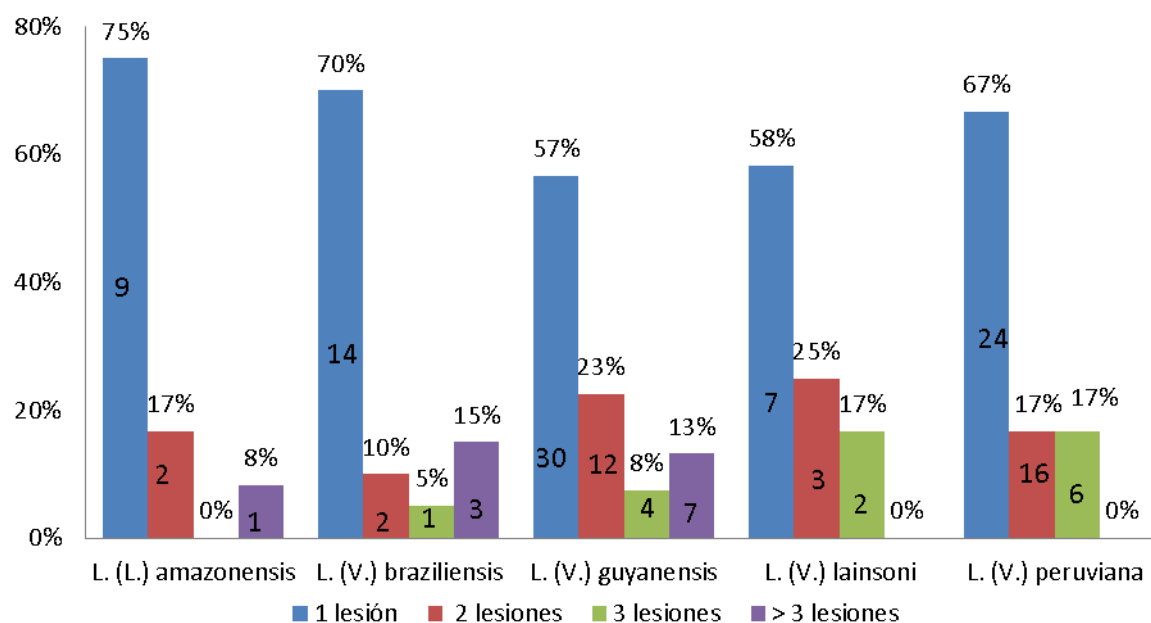
En el gráfico observamos que el tiempo de evolución con mayor porcentaje de presentación se da entre los 3 a 6 meses de enfermedad, tal es así que en los casos producidos por *L. (V.) peruviana* se da en 47%, seguidos por los producidos por *L. (V.) guyanensis* con un 43%.

En los pacientes con tiempo de evolución de 1 a 2 meses, observamos que el mayor porcentaje se da en aquellos causados por *L. (V.) braziliensis* con un 45% y con *L. (V.) guyanensis* en un 34%.

En los pacientes con tiempo de la enfermedad mayor a 6 meses, el mayor porcentaje se da en las causadas por *L. (L.) amazonensis* en un 36.3% y en 20% causada por y *L. (V.) peruviana*.

En los pacientes que tienen menos de 1 mes de evolución, vemos que en los causados por causado por *L. (V.) peruviana* se da en un 28%, seguido de 27% en *L. (L.) amazonensis*.

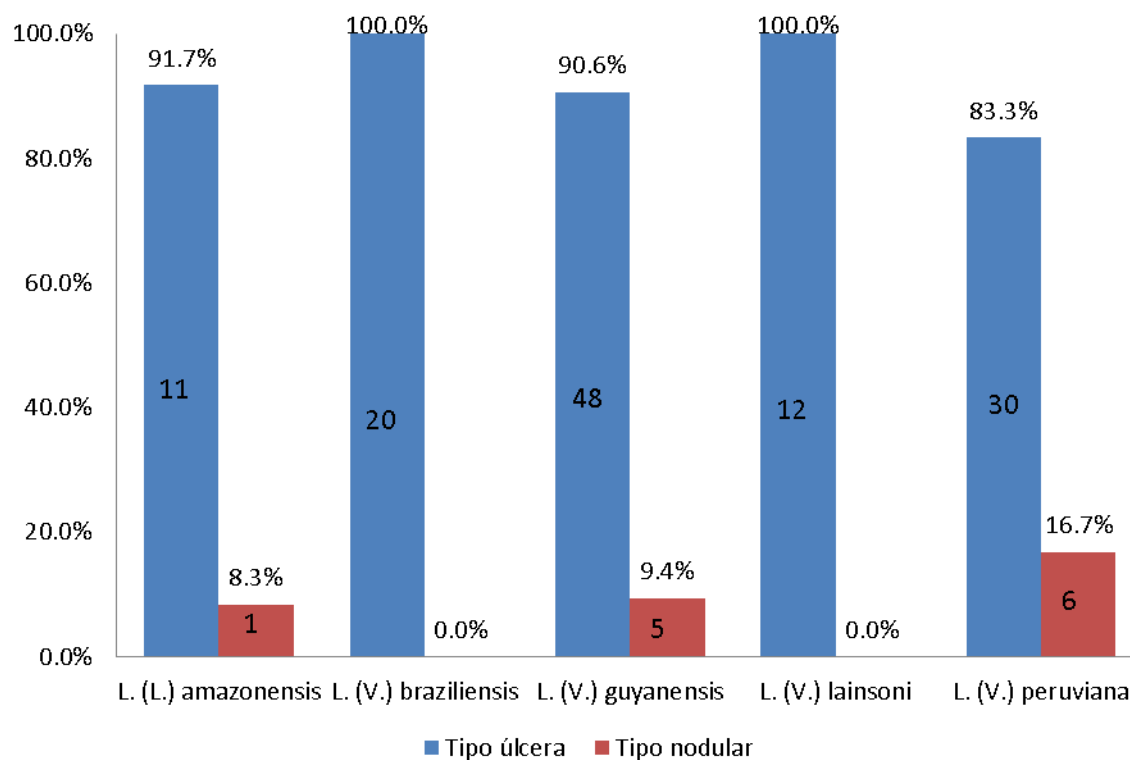
Gráfico 3. Número de lesiones según especie de *Leishmania*, Instituto Nacional de Salud, Años 2006-2011



En el Gráfico 3 observamos que la mayoría de pacientes presentaron una lesión independientemente de la especie implicada. El mayor porcentaje se dio en los causados por *L. (L.) amazonensis* con 75%, seguidos por los ocasionados por *L. (V.) braziliensis* con un 70%, *L. (V.) peruviana* con 66.7%, entre las primeras.

También observamos que la ocurrencia de más de 03 lesiones se dio en las ocasionadas por *L. (V.) braziliensis* con 15%, *L. (V.) guyanensis* con 13% y *L. (V.) amazonensis* con 8%.

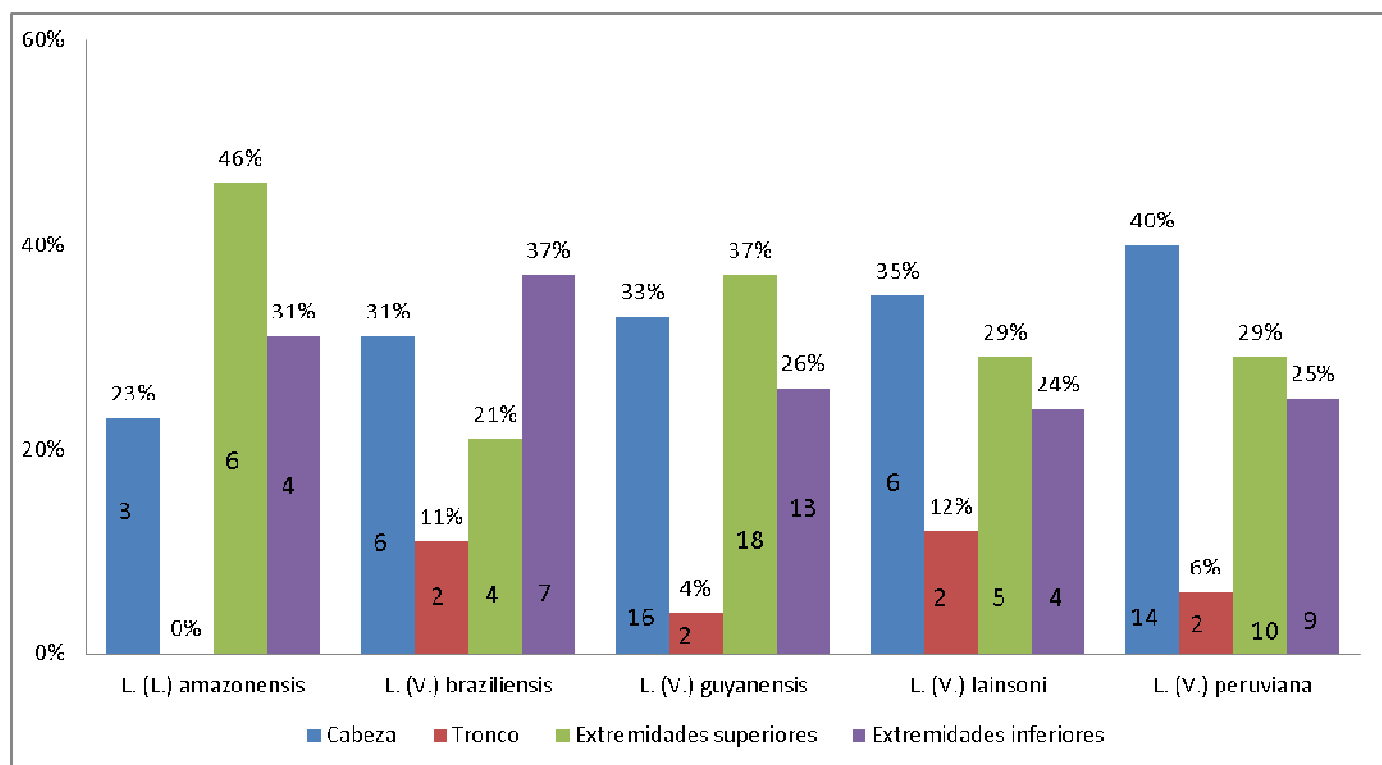
Gráfico 4. Tipo de presentación de lesiones según especie de *Leishmania*, Instituto Nacional de Salud, Años 2006-2011



En relación al tipo de lesiones, en el Gráfico 4 observamos que la presentación tipo ulcerativa es la predominante, sobre todo en las producidas por las especies *L. (L.) braziliensis* y *L. (V.) lainsoni* con un 100%.

La forma nodular se presenta en las especies *L.(V.) amazonensis* con un 8.3%, *L.(V.) guyanensis* 9.4% y *L.(V) peruviana* 16.7%.

Gráfico 5. Localización de lesión en el paciente según especie de Leishmania, Instituto Nacional de Salud, Años 2006-2011



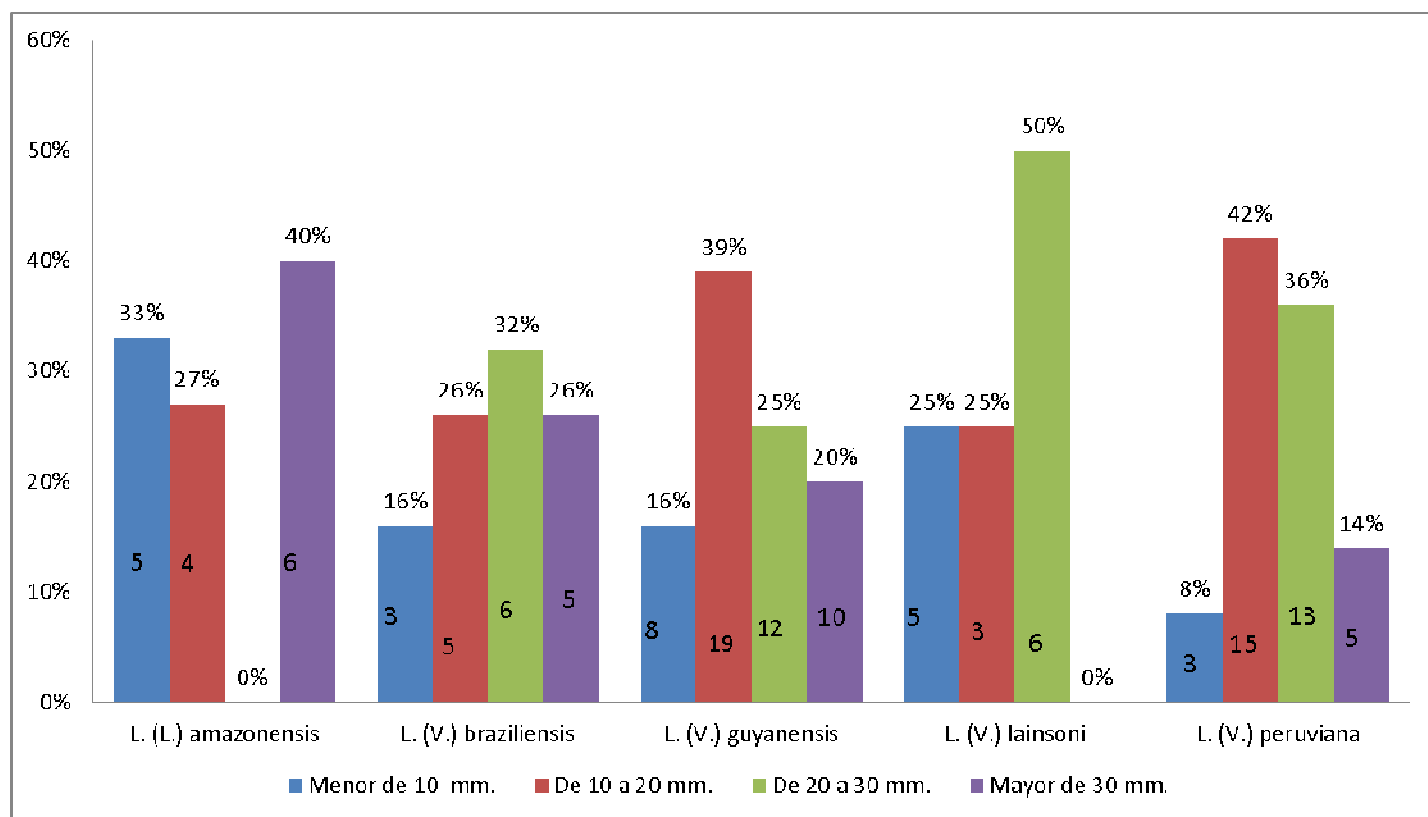
En el Gráfico 5 observamos la localización de las lesiones de leishmaniosis según la especie implicada.

En las lesiones ubicada en extremidades superiores, la *L. (L.) amazonensis* presentó el mayor porcentaje con un 46%, del mismo modo con la especie *L. (V.) guyanensis* con un 37%.

La especies con una mayor localización de las lesiones en cabeza fueron: *L. (V.) peruviana* con un 40%, y *L. (V.) lainsoni* con un 35%

La *L. (V.) braziliensis* tuvo un mayor porcentaje de localización en las extremidades inferiores con un 37%.

Gráfico 6. Superficie de las lesiones según especie de *Leishmania*, Instituto Nacional de Salud, Años 2006-2011

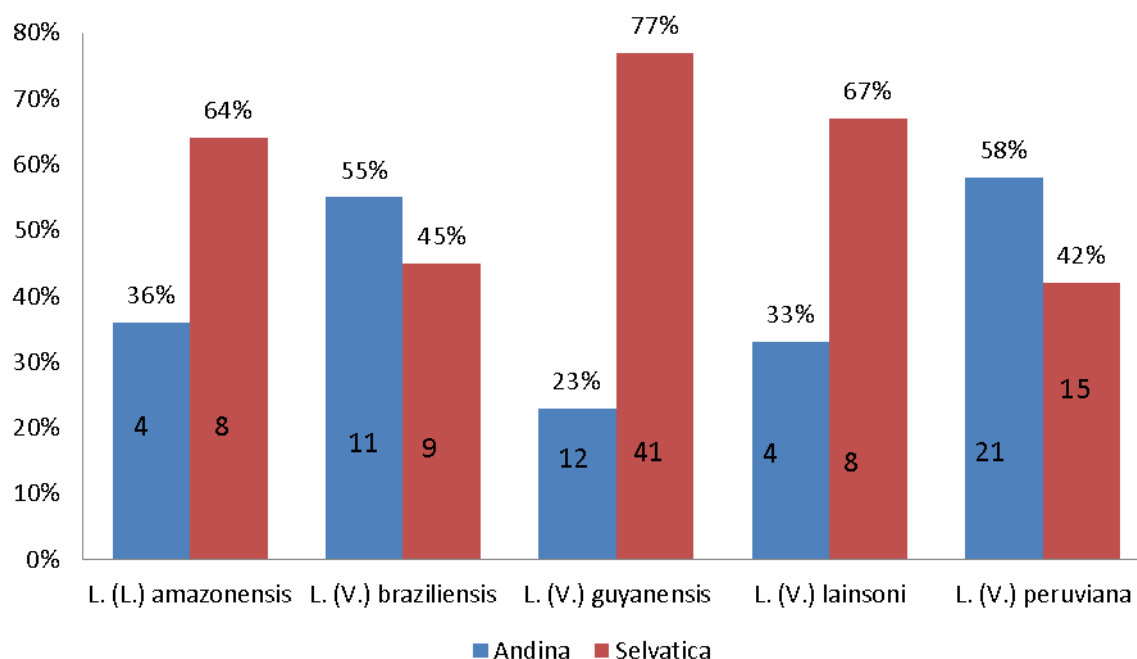


En el Gráfico 6 observamos que la mayor frecuencia de casos se dio en las lesiones con una superficie de 20 a 30 mm., ocasionadas por *L. (V.) lainsoni*. La especie *L. (V.) braziliensis* también tuvo mayor frecuencia de lesiones de 20 a 30 mm.

La especie *L. (V.) amazonensis* suele ocasionar en mayor porcentaje lesiones de más de 30 mm de superficie, en relación a las otras especies con un 40%.

Las especies *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) guyanensis* ocasionaron con mayor frecuencia lesiones de 10 a 20 mm., con 42% y 39% respectivamente.

Gráfico 7. Procedencia de paciente según especie de Leishmania.
Instituto Nacional de Salud, Años 2006-2011



En el Gráfico 7 observamos que los casos de leishmaniosis producidos por las especies *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni* y *L. (L.) amazonensis* proceden en su mayoría de la zona selvática, en porcentajes de 77%, 67% y 64% respectivamente.

En los casos producidos por las especies *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis*, la mayoría procede de la zona andina.

Tabla 2. Especies de *Leishmania* asociadas a la forma clínica cutánea y cutánea-mucosa.

Especies de <i>Leishmania</i>	Forma clínica				%	Total	Valor p*
	Cutánea		Cutánea-mucosa				
	n	%	n	%			
<i>L. (V.) peruviana</i> (n=36) <i>L.(V.) lainsoni</i> (n= 16)	52	100%	0	0	100	52	0.04
<i>L. (V.) braziliensis</i> (n= 19) <i>L.</i> <i>(V.) guyanensis</i> (n=49) <i>L.</i> <i>(L.) amazonensis</i> (n= 13)	75	89,70%	6	10,30%	100,00%	81	
Total	127	95,50%	6	4,50%	100,00%	133	

* Valor para la prueba Chi cuadrada de asociación con significancia estadística
Valor p < 0,05

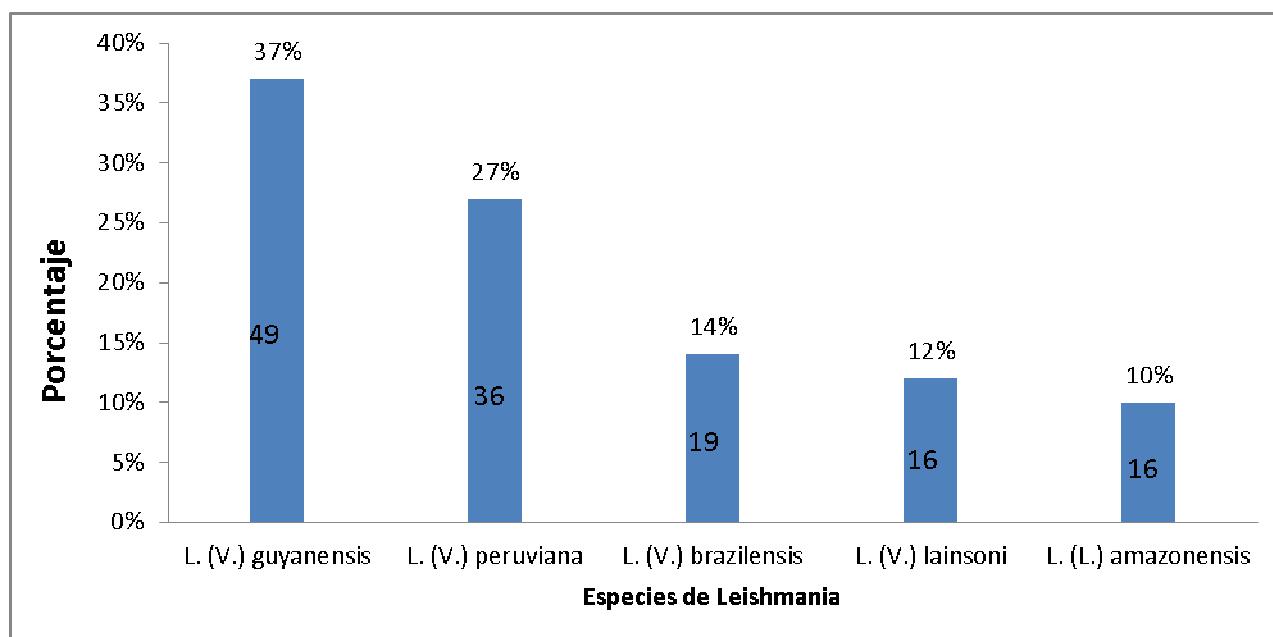
Observamos una asociación entre forma clínica y las especies de *Leishmania* al agrupar todos los casos cutáneos presentados en el estudio se evidencia que fueron producidos por *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) lainsoni*. Así como todos los casos cutáneo-mucosos producidos por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, con un (p= 0,04).

Tabla 3. Distribución de las especies identificadas por la técnica de PCR – HRM de 133 muestras de pacientes que acudieron al INS durante el 2006 – 2011

Región	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>	N
Amazonas	1	2	3		3	9
Ancash			3	2	2	7
Ayacucho	2		1	1	1	5
Cajamarca		1			1	2
Cusco	1	2	5	2	1	11
Huánuco	2	5	4	4	3	18
Junín	1	1	9	3	4	18
La Libertad		3	3			6
Lambayeque					1	1
Lima	2	1		2	9	14
Loreto	1		2			3
Madre de Dios		4	4	2	3	13
Pasco			3		2	5
Piura					2	2
Puno					1	1
San Martín	2		10		1	13
Ucayali	1		2		2	5
Total	13	19	49	16	36	133

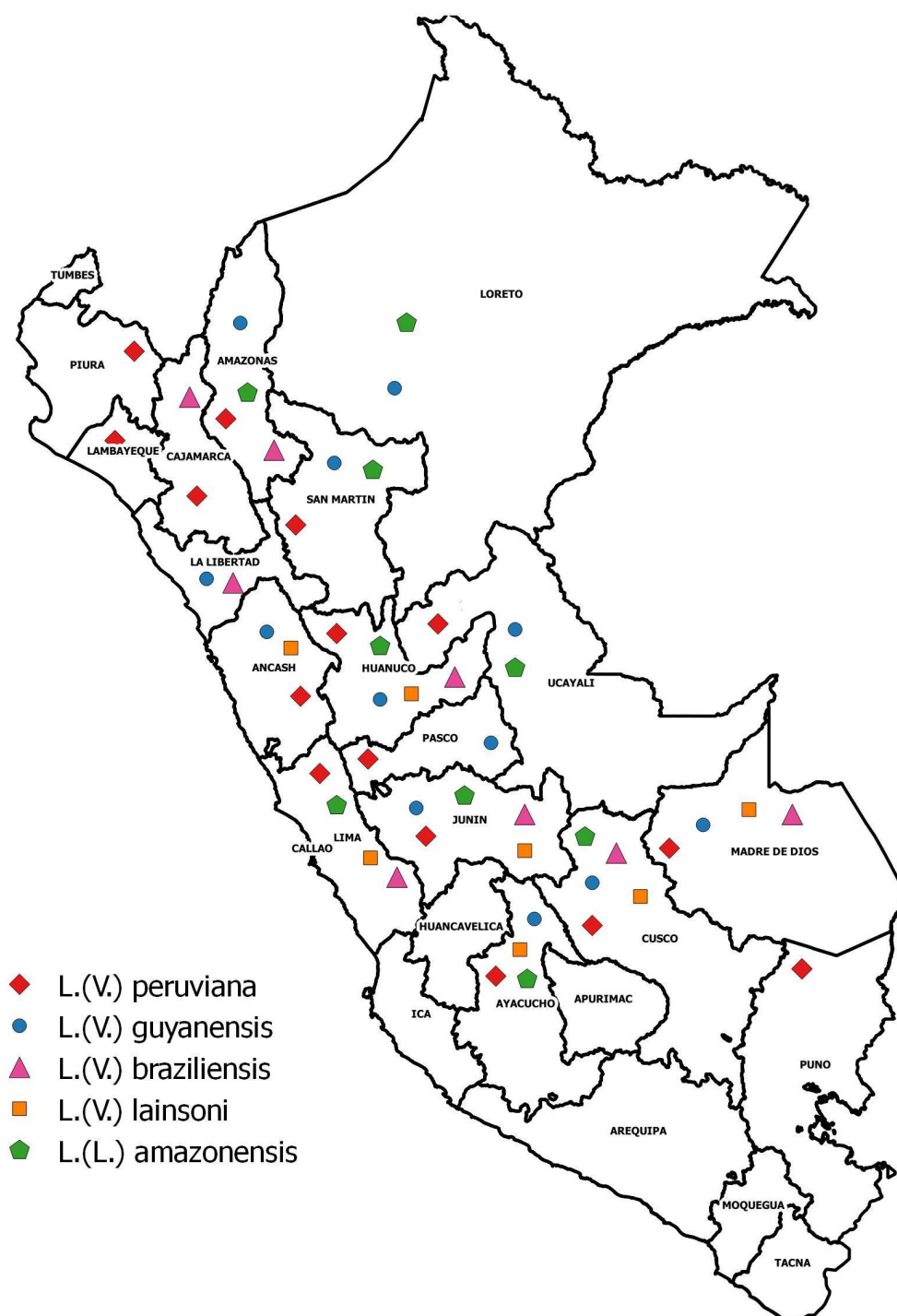
La tabla nos muestra que los departamentos con mayor número de casos fueron de Huánuco (18), Junín (18), Lima (14), San Martín (13) y Madre de Dios (13), además se observó las especie *Leishmania (Viannia) braziliensis* en los departamentos de Huánuco, Madre de Dios y La Libertad, y las especies *Leishmania (Viannia) guyanensis* en Junín y San Martín, la especie de *Leishmania (Viannia) lainsoni* en Huánuco y en los departamentos de Ayacucho, Lima, Huánuco, Loreto y San Martín se encontró *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, la mayor proporción de la especie *Leishmania (Viannia) peruviana* se encontró en el departamento de Lima.

Gráfico 8. Proporción de especies de *Leishmania* identificados mediante la técnica de PCR – HRM, en 133 pacientes con diagnóstico de leishmaniosis atendidos en el INS durante el 2006 – 2011



El gráfico nos muestra la identificación de especies que se realizó a los 133 sujetos positivos a leishmaniosis según la técnica de PCR-HRM, donde se obtuvo el 37% de *Leishmania (Viannia) guyanensis*; el 27% de *Leishmania (Viannia) peruviana*; el 14% de *Leishmania (Viannia) braziliensis*; el 12% de *Leishmania (Viannia) lainsoni*; el 10% de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Gráfico 9. Distribución geográfica de las especies identificadas mediante PCR-HRM, en 133 pacientes de los diferentes departamentos del Perú durante el 2006 – 2011



Observamos en el mapa la distribución geográfica de especies de *Leishmania*, realizado mediante el sistema de georreferenciación.

VI. DISCUSIÓN

En el estudio se revisaron 133 fichas de pacientes con diagnóstico confirmado de leishmaniosis con identificación de especie por PCR-HRM en tiempo real, en donde se encontró asociación significativa entre la forma clínica (cutánea, cutáneo-mucosa) y la especie de *Leishmania* infectante.

La prueba molecular usada en este estudio estuvo basada en la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM) en tiempo real, este ensayo ha sido demostrado al igual que en otros estudios tener una concordancia del 100%, con la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), el análisis mediante la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), los anticuerpos monoclonales (MA), obteniendo un índice kappa igual a 1, por lo que el ensayo de HRM sugerido en este estudio es una técnica fiable, robusta y reproducible que nos permitió diferenciar las especies de leishmania encontrados en este estudio, de manera rápida (no requiere tratamientos post-PCR), es simple y bajo costo, altamente sensibles y fácilmente automatizado, otra característica importante de este ensayo además de su reproducibilidad fue la sensibilidad del método que es capaz de detectar al menos 10 parásitos / mL y se considera un valor alto de sensibilidad. Por lo que muchos estudios sugieren su aplicabilidad de esta técnica, en las diferentes áreas de epidemiología molecular de leishmaniosis, así como las relaciones huésped-parásito, la ecoepidemiología y la dinámica de infección en áreas urbanas y silvestres. Por tanto debe ser una técnica sugerida para ser usada en áreas endémicas de Leishmaniosis, según Hernandez (2014) y Zampieri (2016).

En este estudio al emplear la prueba molecular PCR-HRM en tiempo real permitió identificar las especies infectantes, a partir de DNA parasitario obtenido de las lesiones, de los pacientes que acudieron al laboratorio de leishmaniosis del INS.

La identificación de especies presentes en el estudio fue de 37% de *Leishmania (Viannia) guyanensis*; el 27% de *Leishmania (Viannia) peruviana*; de 14% de *Leishmania (Viannia) braziliensis*; 12% de *Leishmania (Vianna) lainsoni* y 10% de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Al comparar la especie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, con la especie *Leishmania (Viannia) guyanensis* se observó que la oportunidad de tener procedencia andina es mayor en 1,95 veces que si fuese de procedencia selvática.

Así mismo, para la especie *Leishmania (Viannia) amazonensis*, comparada con la especie *Leishmania (Viannia) lainsoni* la oportunidad de tener procedencia andina es mayor en 1,14 veces que si fuese de procedencia selvática.

La forma clínica de leishmaniosis reportadas en nuestro estudio fue similar a la reportada, en otros estudios donde la *Leishmania (Viannia) braziliensis* causó lesiones cutáneo-mucosa y la mayoría de los pacientes presentó una lesión ulcerada, más comúnmente en las extremidades superiores e inferiores, según Falqueto A. (2003), Schrieffer A. (2004), Guerra JAdO (2011) y Grizzo A.L. (2014).

Se observa que la forma mucosa fue causada por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*. En los casos cutáneos fue causada por *L. (V.) peruviana*, resultados que coinciden con los reportados por Tsukayama P. (2012),

Asociación entre cuadro clínico y especie de *Leishmania* spp, en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Salud, 2006 – 2011

Hiroto K., (2010), Adai V. (2011) y Guerra JA. (2011). Y otros estudios realizados en Colombia donde se presentó la forma clínica según la especie causante, se observó que la forma más frecuente era leishmaniosis cutánea (97,08%), seguida de la leishmaniosis cutánea y mucosa simultáneamente (2,19%) y, finalmente, la leishmaniosis difusa (0,73%). La leishmaniosis cutánea fue causada por *L. panamensis* en 74,44%, *L. braziliensis* en 15,79%, *L. guyanensis* en 0,75%, el complejo *L. mexicana* en 3,76%, *L. mexicana* 4,51% y *Leishmania* sp. en 0,75%. La leishmaniosis mucosa y cutánea simultánea fue causada por *L. panamensis* en 66,67% y por *L. mexicana* 33,33%, según Ovalle (2006)

En el presente estudios reportan similares resultados a estudios realizados en Brasil, donde reporta a *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) guyanensis*, como las más prevalentes y causantes de leishmaniosis cutánea. La infección causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* se caracteriza por un cuadro clínico que va desde una ulceración cutánea localizada que afecta a la piel expuesta, por lo general los miembros inferiores, y se asocia a menudo con inflamación de los ganglios linfáticos con adenomegalia satélite, hasta la forma diseminada menos frecuente, según Romero G. (2001).

En este estudio se observó un mayor número de casos en los departamentos de Huánuco, Junín, Lima, Madre de Dios, San Martín y Cusco; encontrándose en mayor proporción *L. (V.) braziliensis* en Huánuco, Madre de Dios y La Libertad; *L. (V.) guyanensis* en San Martín, Junín y Cusco; *L. (V.) lainsoni*, en Huánuco y Junín; en los departamentos de Ayacucho, Huánuco, Lima y San Martín se encontró *L. (L.) amazonensis*.

Un estudio realizado en 127 pacientes, sobre la distribución de especies en Perú, reportó datos similares a los encontrados en este estudio, como es el caso del departamento de La Libertad donde la especie comúnmente reportada es *L. (V.) peruviana*, según Llanos-Cuentas A, et al. (2008). En el presente estudio, en dicho departamento se encuentra *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) braziliensis*.

Otro hallazgo del presente trabajo fue que la exposición ocupacional ocurrió principalmente entre las personas que trabajan en la agricultura, extracción de madera, minería y las fuerzas armadas, y el tiempo de enfermedad fue, en su mayoría de 3 a 6 meses y con mayor frecuencia en las extremidades superiores e inferiores, con un diámetro mayormente de 10 a 20 mm por lesión.

Este estudio ha permitido describir por primera vez especies en lugares donde aún no fueron descritas por ejemplo: *L. (V.) peruviana* en Puno y Pasco. Así como, la especie *L.(V.) braziliensis* en la Libertad; *L.(V.) lainsoni* en Ancash, Junín y Lima; *L.(L.) amazonensis* en Loreto, Lima, Cusco y San Martín; *L.(V.) guyanensis* en Ayacucho, Loreto y La Libertad.

La distribución de especies en los diferentes departamentos en la actualidad se debe a que con el transcurrir del tiempo han ocurrido muchos cambios climatológicos, lo cual ha ocasionado el desplazamiento del vector a otras áreas naturales, así como también el desplazamiento migratorio de la población hacia donde los escenarios epidemiológicos fueran propicios para establecerse la enfermedad y se convierta en áreas endémicas de leishmaniosis.

Dentro de las limitaciones del estudio, debemos mencionar que, si bien es el estudio que ha incluido un mayor número de pacientes para la diferenciación de cepas de *Leishmania* en el Perú, estos pacientes han llegado de manera pasiva al Instituto Nacional Salud, por lo que la muestra puede estar sesgada al acceso de los pacientes a la ciudad de Lima. Además, el reducido número de pacientes con lesiones cutáneo-mucosas, que acudieron al Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional Salud, lo cual pudo influir en el valor p. Cabe resaltar la limitación que se tuvo al realizar la extracción de la muestra de los pacientes con lesiones cutáneo-mucosas, y ausencia de metodologías alternativas a la toma de muestra por biopsia en pacientes con lesiones cutáneo-mucosas.

VII. CONCLUSIONES

1.- Empleando la técnica de PCR-HRM, se identificaron las especies: *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

2.- Se encontró asociación entre la forma clínica cutánea, cutáneo-mucosa y especie de *Leishmania* infectante [$p = 0.04$]. Según los hallazgos del estudio las especies *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) lainsoni*, no presentaron la forma clínica cutáneo-mucosa. En tanto en las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, estas si presentaron formas cutáneas y cutáneo-mucosas.

3.- Se identificaron especies de *Leishmania* en áreas geográficas no reportadas anteriormente como, *L.(V.) peruviana* en Pasco y Puno; *L.(V.) braziliensis* en la Libertad; *L.(V.) lainsoni* en Ancash, Junín y Lima; *L.(L.) amazonensis* en Lima, Loreto, Cusco y San Martín; *L.(V.) guyanensis* en Ayacucho, La Libertad y Loreto.

VIII. RECOMENDACIONES

- 1.- La identificación de las especies de *Leishmania* a través de la técnica de PCR-HRM en tiempo real, es un método rápido y fiable con utilidad en estudios de asociación parásito-huésped, tanto en el humano como en el vector, el cual puede ser reproducible en áreas endémicas de leishmaniosis.
- 2.- Se propone realizar estudios semejantes en coordinación con las Diresas, a fin de captar de manera activa y prospectiva una mayor cantidad de pacientes con leishmaniosis.
- 3.- Incrementar el número de muestras de pacientes procedentes de las regiones donde las especies circulantes de *Leishmania* son inusuales para el área endémica.
- 4.- Realizar estudios relacionando la especie de *Leishmania* infectante en casos de pacientes con falla al tratamiento o recaídas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adaui V, Maes I, Huyse T, Van den Broeck F, Talledo M, Kuhls K, *et al.* (2011) Multilocus genotyping reveals a polyphyletic pattern among naturally antimony-resistant *Leishmania braziliensis* isolates from Peru. *Infection, Genetics and Evolution* (11):1873–1880.

Alvar J, Vélez I, Bern C, Herrero M, Desjeux P, *et al.* (2012). Leishmaniasis Worldwide and global Estimates of its Incidence. *PLoS ONE*; 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.

Arévalo *et al.* (2007). Influence of *Leishmania* (Viannia) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 195:1846-51.

Arenas R. (2005). Leishmaniosis. *Atlas. Dermatología, diagnóstico y tratamiento*. (111): 456-459.

Barrio A, Bustos M, Mora M, *et al.* (2009). Identification by PS-PCR of *Leishmania* Species and its Correlation with Clinical, epidemiologic, and therapeutic Characteristics in Salta, Argentina. *Revista Argentina de Salud Pública*. 1(1):30-33.

Camara L, Paes M, Guerra J, Graças M, Coelho C, Lima B, *et al.* (2011). Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res.* (108):671–677.

Cantanhêde LM, da Silva Júnior CF, Ito MM, Felipin KP, Nicolete R, Salcedo JMV, *et al.* (2015) Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania RNA Virus 1* and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0004079. doi:10.1371/journal.pntd.0004079)

Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. MINSA. Sala situacional de salud Perú. Semana Epidemiológica 18 - 2016. Lima: MINSA.

Desjeux P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27:305–318

Dujardin J-C, Campino L, Cañavate C, Dedet J-P, Gradoni L, Soteriadou K, et al. (2008). Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 14 (7): 1013-1018

Falqueto A., Sessa PA., Ferreira AL., Vieira VP., Santos CB., Varejao JMB., et al. (2003). Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 98(8):1003-1010.

Fraga J, Veland N, Montalvo A, Praet N, Boggil A, et al. (2012). Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 74:142-150.

Grizzo A.L., Pereira J., Barreto J., Grizzo A.C. (2014). American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters, *An Bras Dermatol*. 89(1):52-8.

Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. 2007. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 101:368 –371.

Guerra JAdO, Prestes SR, Silveira H, Coelho LIdARC, Gama P, et al. (2011) Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PloS Neglec Trop*

Asociación entre cuadro clínico y especie de *Leishmania* spp, en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Salud, 2006 – 2011

Dis. 5(3): e980. doi:10.1371/journal.pntd.0000980.

Hiroto Kato, Abraham G. Cáceres, *et al.* (2010). Use of FTA Cards for Direct Sampling of Patients Lesions in the Ecological study of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*; 48(10):3661-3665.

Hernández C, Álvarez C, González C, Ayala MS, León CM. and Ramírez JD. (2014). Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors*, (7):501.

Llanos-Cuentas A, *et al.* (2008). Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin. Infect. Dis.* 46:223–231.

Organización Mundial de la Salud. Control de la Leishmaniosis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniosis. Ginebra, 22 al 26 de Marzo 2010. OMS. Serie de Informes Técnicos: 949.

Oficina Panamericana de la Salud. Leishmaniosis. Boletín Epidemiológico de la OPS; 2002; 23(3): 13-14.

Ovalle C, Porras L, Rey M, Ríos M, Camargo Y. (2006). Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. *Biomédica*; 26(1):145-51

QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook - QIAGEN. 2007; Second edition.

Quantum GIS. Quantum GIS 2.2 (2014). Disponible en; <http://www.qgis.com>

Pérez JE, Veland N, Espinosa D, Torres K, Ogusuku E, Llanos-Cuentas A, et al. (2007). Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(6): 655-658.

Rojas-Palomino N, Minaya-Gómez G, Sandoval-Juárez A, Omar Cáceres, (2015). *Leishmania* species identification by High Resolution Melting Analysis (HRMA) in Peru. *ASTMH*, Original Abstract Number: 3198 New Presentation Number: 1088.

Reveiz L, Maia-Elkhoury ANS, Nicholls RS, Sierra Romero GA, Yadon ZE (2013) Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. *PLoS ONE* 8(4): e61843. doi:10.1371/journal.pone.0061843.

Ruskova L, Raclavsky V., (2011) "The potential of high resolution melting analysis (HRMA) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology", *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* Sep;155(3):239-52. doi: 10.5507/bp.2011.045.

Romero G., et al., (2001) Comparison of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Clinical Findings and Diagnostic Approach. *CID*;(32), 1304 – 1312.

Sánchez-Saldaña L., Sáenz-Anduaga E., Pancorbo-Mendoza J., et al. (2004) Leishmaniosis, *Dermatología Peruana*; vol. 14 N° 2.

Schwartz E, Hatz C, Blum J.(2006) New world cutaneous leishmaniasis in travelers, The Center for Geographic Medicine and Tropical Diseases, Chaim Sheba Medical Center, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Israel; 6(6):342-9

Schriefer A., Schriefer A.L:F., Goés-Neto A., Guimaraes L.H., Carvalho L.P., y col. (2004) Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical implication in a Region of Endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, Jan. vol. 72 (1): 508-514.

Sierra G, De Farias M, Gomes M, and Oliveira V. (2001) Comparison of cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Therapeutic Response to Meglumine Antimoniate *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65(5): 456–465.

Tsukayama P, Núñez JH, De Los Santos M, Soberón V, Lucas CM, *et al.* (2013). A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 7(1): e1956. doi: 10.1371/journal.pntd.0001956

Tojal A, Cupolillo E, Volpini A, Roque Almeida R, and Sierra G. (2006). Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Tropical Medicine and International Health*. 11(9):1388-1398.

Van der Auwera G, Dujardin J-C. (2015). Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* doi:10.1128/CMR.00104-14.

Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Stocco de Lima AC, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. (2016). High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. *PLoS Negl Trop Dis* 10(2): e0004485. doi:10.1371/journal.

Urbano J, Minaya G, Sánchez-Moreno M, Gutiérrez-Sánchez R. and Marín C.(2011). Molecular characterization and geographical distribution of leishmaniasis aethiological agents in Peru. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 70 (2): 145-156.

X. ANEXOS

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA
LABORATORIO REFERENCIAL DE LEISHMANIOSIS Y CHAGAS**

FICHA EPIDEMIOLÓGICA DE LEISHMANIOSIS

ESTABLECIM.SALUD.....**N.º HIST**.....
.....**FECHA**.....

Apellido paterno Apellido materno Nombres

EDAD: **SEXO:** **RAZA:**

LUGAR DE NACIMIENTO:
.....

PROBABLE LUGAR CONTAGIO:
..... Dpto. Prov. Dist. Caserío
..... Dpto. Prov. Dist. Caserío

ALTITUD (m.s.n.m.)

OCUPACIÓN ACTUAL:

- | | | |
|---------------|---------------|-----------|
| 1. Agricultor | 3. Estudiante | 5. Minero |
| 2. Maderero | 4. Su casa | 6. Otros |

ACTIVIDAD DESARROLLADA DURANTE EL CONTAGIO:

- | | | |
|------------------------------|----------------------|---------------|
| 1. Agricultura sin desbosque | 2. Extracción de oro | 3. Carreteras |
| 4. Agricultura con desbosque | 5. Otros | |

TIEMPO RESIDENCIA LUGAR CONTAGIO: días: meses: años:

RESIDENCIA ACTUAL.....

..... Dpto. Prov. Dist. Caserío

FORMA CLÍNICA:

- | | |
|-------------------|-----------------------|
| 1. Andina cutánea | 4. Selvática cutánea |
| 2. Andina mucosa | 5. Selvática mucosa |
| 3. Visceral | 6. Cutánea diseminada |

TIEMPO ENFERMEDAD CUTÁNEA: días:..... meses..... años.....

NÚMERO DE LESIONES:

TIPO DE LESIONES:

- | | | |
|---------------|------------------|-----------------|
| 1. Ulcerativa | 2. Proliferativa | 3. Infiltrativa |
| 4. Nodular | 5. Cicatriz | 6. Otros |

LOCALIZACIÓN DE LESIONES: Diferenciar activas de cicatriciales

ACTIVAS:	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3	LESIÓN 4
Localización
Tiempo evolución
Tamaño (mm)

CICATRICIALES:	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3	LESIÓN 4
Localización
Tiempo evolución
Tamaño (mm)

RECIBIÓ TRATAMIENTO **SÍ:** **NO:** **NO RECUERDA:**

MEDICAMENTO **N.º Ampollas** **Dosis** **Fechas de aplicación**

Glucantime De A.....

Pentostam De A.....

Asociación entre cuadro clínico y especie de *Leishmania* spp, en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Salud, 2006 – 2011

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA
LABORATORIO REFERENCIAL DE LEISHMANIOSIS Y CHAGAS**

VIA DE ADMINISTRACIÓN: Intramusc.: Endovenoso: Intralesional:

OTROS TRATAMIENTOS: **SÍ ()** **NO ()**
Remedio Vegetal Quemó lesión.....
Otros No recuerda.....

1. Cura completa () 2. Mejoría () 3. No modificó ()
4. No recuerda ()

LESIÓN MUCOSA: **SÍ ()** **NO ()** **Si la respuesta es SÍ:**

INICIO DE LA ENFERMEDAD:

DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD: Días Meses Años

EXTENSIÓN DEL COMPROMISO MUCOSO:

1. Fosas nasales 4. Laringe 7. Lengua
2. Septo nasal (tabique) 5. Úvula 8. Labios
3. Epiglotis 6. Paladar 9. Faringe

ANTECEDENTES DE TRATAMIENTO ACTUAL: **SÍ ()** **NO ()**

Si la respuesta es afirmativa:

MEDICAMENTO	N.º Ampollas	Dosis	Fechas de aplicación
Glucantime	De A.....
Pentostam	De A.....
Otros	No recuerda.

VIA DE ADMINISTRACIÓN: Intramusc.: Endovenoso: Intralesión:.....

PRUEBAS DE LABORATORIO EFECTUADAS:

LEISHMANINA	FROTIS	CULTIVO	IFI	HISTOLOGIA	OTRO
-------------	--------	---------	-----	------------	------

FECHA OBT.
RESULTADO

TRATAMIENTO ACTUAL:

DROGA: DOSIS:
Fecha de inicio:..... Fecha de término
Efectos colaterales.....

ANTECEDENTES DEL VECTOR:

Cómo cree que se infectó?

Presencia de *Lutzomyia* en la zona **SÍ ()** **NO ()**

Ficha extraída del, Manual de Procedimientos de Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud 2000.